

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 198 39 216 C 1

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 08 L 5/00**  
C 08 J 3/14  
C 08 L 3/00  
B 01 D 15/08  
A 61 K 9/16  
C 08 B 37/00

⑳ Aktenzeichen: 198 39 216.8-44  
㉔ Anmeldetag: 28. 8. 1998  
㉓ Offenlegungstag: -  
㉕ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 20. 1. 2000

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:

Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG,  
65929 Frankfurt, DE

⑦2 Erfinder:

Bengs, Holger, Dr., 60598 Frankfurt, DE; Grande,  
Jürgen, 65812 Bad Soden, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

DE-OS 197 37 481  
DE-OS 197 29 273  
US 39 47 604

CAPLUS-Abstract 1997:148459;

⑤4 Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen Verzweigungen enthaltenden Polyglucan bestehen, sowie mit diesem Verfahren erhältliche Mikropartikel und die Verwendung

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen Polysaccharid bestehen, wobei das mindestens eine wasserunlösliche Polysaccharid in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöst wird, die gebildete Lösung in ein Fällmittel oder Fällmittelgemisch eingebracht wird, das dabei entstehende Gemisch gegebenenfalls gekühlt wird und die gebildeten Mikropartikel abgetrennt werden, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polysaccharid ausgewählt ist unter einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan mit einem Verzweigungsgrad von größer Null und maximal 8% und einer Mischung aus einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan und einem linearen Polysaccharid, wobei der Anteil an Verzweigungen enthaltenden Polyglucan in der Mischung maximal 30 Gew.-% bezogen auf das Gesamtgewicht des Polysaccharids und Polyglucans ist.

DE 198 39 216 C 1

DE 198 39 216 C 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen Verzweigungen enthaltenden Polyglucan bestehen, sowie mit diesem Verfahren erhältliche Mikropartikel.

Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, die wasserunlösliche lineare Polysaccharide enthalten, sind in der prioritätsälteren nicht-vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung Nr. 197 37 481.6 der Anmelderin beschrieben. Mit diesem Verfahren können sphärische Mikropartikel erhalten werden, die sich insbesondere durch eine hohe Einheitlichkeit in bezug auf ihre Gestalt und Verteilung des Durchmessers sowie gute mechanische Eigenschaften auszeichnen.

Aufgrund ihrer vergleichsweise regelmäßigen Beschaffenheit bei gleichzeitig guten mechanischen Eigenschaften können diese Mikropartikel für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden.

Als Ausgangsmaterial werden für das dort beschriebene Verfahren lineare wasserunlösliche Polysaccharide wie z. B. Polyglucane eingesetzt, die keine Verzweigungen aufweisen bzw. für die mit herkömmlichen Meßmethoden keine Verzweigungen nachgewiesen werden können. Lineare Polysaccharide bzw. Polyglucane kommen jedoch in der Natur nicht in reiner Form vor. Sie müssen daher entweder aus nativen Quellen wie z. B. Stärke mittels aufwendiger Verfahren isoliert oder hergestellt werden oder über biotechnische Verfahren gewonnen werden.

Insbesondere die Aufreinigung von Polysacchariden natürlichen z. B. pflanzlichen Ursprungs zu Verbindungen mit der erforderlichen hohen Linearität ist vergleichsweise Zeit- und kostenintensiv, so daß natürliche Quellen bisher nur bedingt einsetzbar sind. In Hinblick auf ihre allgemeine Verfügbarkeit und Kostengünstigkeit ist jedoch eine weite Nutzung der natürlichen Quellen wünschenswert.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß auch bei Einsatz von Polyglucanen, die Verzweigungen enthalten, qualitativ zufriedenstellende sphärische Mikropartikel erhalten werden können, die für eine Vielzahl von Anwendungen erfolgreich eingesetzt werden können.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen Polysaccharid bestehen, wobei das mindestens eine wasserunlösliche Polysaccharid in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöst wird, die gebildete Lösung in ein Fällmittel oder Fällmittelgemisch eingebracht wird, das dabei entstehende Gemisch gegebenenfalls gekühlt wird und die gebildeten Mikropartikel abgetrennt werden, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polysaccharid ausgewählt ist unter einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan mit einem Verzweigungsgrad von größer Null und maximal 8% und einer Mischung aus einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan und einem linearen Polysaccharid, wobei der Anteil an Verzweigungen enthaltenden Polyglucan in der Mischung maximal 30 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Polysaccharids und Polyglucans, ist.

Der erfindungsgemäße Ersatz zumindest eines Teils der linearen Ausgangsverbindungen durch Verzweigungen enthaltende Polyglucane bedeutet eine wesentliche Vereinfachung und Verrbilligung des in Anmeldung Nr. 197 37 481.6 beschriebenen Verfahrens. Insbesondere vereinfacht das erfindungsgemäße Verfahren den Rückgriff auf natürliche Polyglucanquellen, wodurch eine billige und nachwachsende Rohstoffquelle für das vorliegende Verfahren nutzbar gemacht wird.

In diesem Sinne versteht sich die vorliegende Erfindung als vorteilhafte erfinderische Weiterbildung der vorstehend genannten deutschen Patentanmeldung Nr. 197 37 481.6.

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird der Offenbarungsgehalt der deutschen Patentanmeldung Nr. 197 37 481.6 vollinhaltlich miteinbezogen.

Weiter betrifft die vorliegende Anmeldung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche sphärische Mikropartikel.

Die **Abb. 1** bis **4** zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM, Camscan S-4) von erfindungsgemäßen Mikropartikeln:

**Abb. 1:** erfindungsgemäße Partikel gemäß Beispiel 1b in 5000  $\times$  Vergrößerung,

**Abb. 2:** Partikel nach **Abb. 1b** in 20000  $\times$  Vergrößerung,

**Abb. 3:** erfindungsgemäße Partikel nach Beispiel 2 in 5000  $\times$  Vergrößerung,

**Abb. 4:** erfindungsgemäße Partikel nach **Abb. 3** in 20000  $\times$  Vergrößerung,

Polyglucane setzen sich aus Glucanen als monomeren Wiederholungseinheiten zusammen, die über Glykosidbindungen miteinander verknüpft sind.

Linearität liegt vor, wenn jedes Monomer in dem Polymergerüst lediglich mit zwei weiteren Wiederholungseinheiten im Molekül über glykosidische Bindung verknüpft ist. Davon ausgenommen sind die beiden Wiederholungseinheiten, die den Anfang und das Ende des Polymers bilden.

Bei drei oder mehr Verknüpfungen pro Wiederholungseinheit wird von Verzweigung gesprochen. Dabei ergibt sich aus der Anzahl der Hydroxylgruppen pro 100 Wiederholungseinheiten, die nicht am Aufbau des linearen Polymerückgrats beteiligt sind und Verzweigungen ausbilden, der sogenannte Verzweigungsgrad VG.

Abgesehen von den beiden an der Ausbildung des linearen Polymerückgrats beteiligten Hydroxylgruppen, besitzt jede Wiederholungseinheit im Fall von Polyglucan drei freie Hydroxylgruppen.

Für die vorliegende Beschreibung wird für den Ausdruck "Verzweigungen enthaltendes Polyglucan" synonym auch die Bezeichnung "Polyglucan mit Verzweigungen" verwendet.

Gemäß einer ersten Ausführungsform wird anstelle des linearen Polysaccharids ein Polyglucan mit Verzweigungen eingesetzt.

Das Polyglucan weist hierbei einen Verzweigungsgrad von größer 0 bis maximal 8%, vorzugsweise maximal 5%, auf.

Bevorzugte Werte für die untere Grenze des Verzweigungsgrades sind wie folgt: in 6-Position größer 0,5% und/oder in jeder anderen Position jeweils größer 0,5% und insbesondere größer 1%.

Selbstverständlich können in dieser ersten Ausführungsform dem Polyglucanen mit Verzweigungen beliebige Anteile an wasserunlöslichem linearen Polysaccharid zuge-mischt werden.

Je höher der Anteil an linearer Struktur ist, umso gleichförmiger sind jedoch die erhaltenen Mikropartikel. Besonders gleichförmige Partikel können erhalten werden, wenn der Anteil an Verzweigungen enthaltenden Polyglucan maximal 30 Gew.-%, vorzugsweise maximal 20 Gew.-% und insbesondere maximal 10 Gew.-%, beträgt.

In einer zweiten Ausführungsform wird für das erfindungsgemäße Verfahren eine Mischung aus einem wasserunlöslichen linearen Polysaccharid und einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan eingesetzt, wobei der Anteil an

Verzweigungen enthaltenden Polyglucan bezogen auf die Gesamtmenge an linearem Polysaccharid und Polyglucan mit Verzweigungen maximal 30 Gew.-%, vorzugsweise 20 Gew.-% und insbesondere 10 Gew.-%, beträgt.

In diesem Fall ist der Verzweigungsgrad des Polyglucans mit Verzweigungen unerheblich.

Auch hier gilt, daß im allgemeinen die Gleichförmigkeit der Partikel zunimmt, je höher der Anteil an linearer Struktur bzw. je niedriger der Verzweigungsgrad ist.

Die hier verwendeten Polyglucane können Verknüpfungen und Verzweigungen in beliebiger Position der Glucanmonomere aufweisen.

Bevorzugt sind jedoch Polyglucane, deren Polymerrückgrat über 1,4-alphaglykosidische Verknüpfungen gebildet ist. Die Verknüpfung der Verzweigungen kann beliebig sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform stammen die für die Erfindung verwendeten Polyglucane mit Verzweigungen von Stärke oder Stärkeanaloga ab, die vorzugsweise pflanzlichen oder tierischen Ursprungs sind.

Eine Gruppe von Stärken, die im Rahmen der Erfindung zum Einsatz gelangen können, umfaßt die aus pflanzlichen Rohstoffen gewonnenen Stärken. Hierzu zählen unter anderem Stärken aus Knollen, wie Kartoffeln, Maniok, Maranta, Batata, aus Samen wie Weizen, Mais, Roggen, Reis, Gerste, Hirse, Hafer, Sorghum, aus Früchten, wie Kastanien, Eicheln, Bohnen, Erbsen, und ähnlichen Hülsenfrüchten, Bananen, sowie aus Pflanzenmark, z. B. der Sagopalme.

Üblicherweise bestehen die aus pflanzlichen Rohstoffen gewinnbaren Stärken im wesentlichen aus Amylose, einem Poly(1,4-alpha-D-glucan), und Amylopektin, einem Poly(1,4-alpha-D-glucan) mit 1,6-Verzweigungen, in wechselnden Mengenverhältnissen.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Polyglucane können auch aus gentechnisch oder biotechnisch veränderten Pflanzen gewonnen werden.

Beispielsweise kann durch die gentechnische oder biotechnische Modifikation die Produktion eines Polyglucans mit höherem linearen Anteil oder eine leichtere Separierung der enthaltenden Stärke bewirkt werden.

Unter Stärkeanaloga werden Verbindungen verstanden, die aus Polyglucanen bestehen, aber nicht-pflanzlichen Ursprungs sind. Ein Beispiel hierfür ist das Glykogen, ein dem Amylopektin entsprechendes Polyglucan, das tierischen Ursprungs ist, oder Dextran, das aus Bakterien gewonnen wird.

Es versteht sich, daß die erfindungsgemäß eingesetzten, Verzweigungen enthaltenden Polyglucane auch biotechnisch, z. B. biokatalytisch oder fermentativ, gewonnen sein können.

Es können auch modifizierte Polyglucane eingesetzt werden, wobei die Polyglucane beispielsweise durch Veresterung und/oder Veretherung einer nicht an der Bildung des Polymerrückgrats beteiligten Hydroxylgruppe chemisch modifiziert worden sind. Maßnahmen für derartige Modifizierungen sind dem Fachmann hinlänglich bekannt.

Geeignet sind auch sogenannte alpha-amylase resistente Polyglucane.

Bei Bedarf können diese Stärke und Stärkeanaloga zur Anreicherung der linearen Struktur mit einem beliebigen dafür geeignetem Verfahren aufgereinigt oder behandelt werden.

Geeignete Aufreinigungsverfahren umfassen z. B. Trennprozesse wie Absorptionsverfahren, Fällprozesse mit oder ohne weitere Hilfsmittel, Zentrifugation, Ausnutzen unterschiedlicher Löslichkeiten, chromatographische Verfahren etc.

Es können auch Entzweigungstechniken zum Einsatz kommen, wobei Verzweigungen in dem Polyglucan chemisch oder enzymatisch verringert werden.

Beispielsweise lassen sich mit Enzymen wie Amylasen, iso-Amylasen, Pullulanasen oder Gluconohydrolasen Verzweigungen vom Polymerrückgrat abspalten, so daß nach ihrer Abtrennung Polymere mit dem gewünschten geringeren Verzweigungsgrad vorliegen.

Weiter kann eine Erhöhung der Linearität dadurch erfolgen, daß enzymatisch einzelne Ketten von verzweigten Polyglucanen verlängert werden, wodurch der Verzweigungsgrad verringert wird.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren linearen Polysaccharide können beliebigen Ursprungs sein. Sie können aus natürlichen Quellen, die gegebenenfalls gentechnisch oder biotechnisch modifiziert sein können, oder über biotechnische Verfahren gewonnen sein. Eine sehr vorteilhafte Methode für die biotechnische Gewinnung ist beispielsweise in der WO 95/31 553 beschrieben, auf die hier ausdrücklich bezug genommen wird.

Sie können, wie vorstehend für die verzweigten Polyglucane beschrieben, chemisch modifiziert sein.

Es können auch alpha-amylase resistente lineare Polysaccharide eingesetzt werden, wie sie z. B. in der prioritätsälteren nicht-vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung Nr. 198 30 618.0, auf die hier ebenfalls ausdrücklich bezug genommen wird.

Insbesondere können dieselben linearen Polysaccharide eingesetzt werden wie sie in der deutschen Anmeldung Nr. 197 37 481.6 beschrieben sind.

Bevorzugte Beispiele sind lineare Polyglucane wie Poly(1,4-alpha-D-glucan) und Poly(1,3-beta-D-glucan), wobei Poly(1,4-alpha-D-glucan), insbesondere biotechnisch gewonnen, besonders bevorzugt ist.

Im folgenden wird soweit auf die wasserunlöslichen Polyglucane mit Verzweigungen und die wasserunlöslichen linearen Polysaccharide gemeinsam bezug genommen wird, der Ausdruck "Polyglucan/saccharid" verwendet.

Unter dem Begriff "wasserunlösliche Polyglucane/saccharide" werden für die vorliegende Erfindung Verbindungen verstanden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB = Deutsches Arzneimittelbuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Auflage, 1987) entsprechend den Klassen 4 bis 7 unter die Kategorien "wenig löslich", "schwer lösliche", "sehr schwer lösliche" bzw. "praktisch unlösliche" Verbindungen fallen.

Für die vorliegende Erfindung sind schwer lösliche bis praktisch unlösliche Verbindungen, insbesondere sehr schwer lösliche bis praktisch unlösliche Verbindungen, bevorzugt.

Im Fall der erfindungsgemäß verwendeten Polyglucane/saccharide bedeutet dies, daß vorzugsweise mindestens 98% der eingesetzten Menge, insbesondere mindestens 99,5%, unter Normalbedingungen ( $T = 25^{\circ}\text{C} \pm 20\%$ ,  $p = 101325 \text{ Pascal} \pm 20\%$ ) in Wasser unlöslich ist (entsprechend den Klassen 4 bzw. 5).

"Sehr schwer löslich" entsprechend Klasse 6 kann durch folgende Versuchsbeschreibung veranschaulicht werden:

Ein Gramm des zu untersuchenden Polyglucans/saccharids werden in 1 l entionisierten Wasser auf  $130^{\circ}\text{C}$  unter einem Druck von 1 bar erhitzt. Die entstehende Lösung bleibt nur kurzzeitig über wenige Minuten stabil. Beim Erkalten unter Normalbedingungen fällt die Substanz wieder aus. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Abtrennung mittels Zentrifugieren können unter Berücksichtigung der experimentellen Verluste mindestens 66% der eingesetzten Menge zurückgewonnen werden.

Die Molekulargewichte  $M_w$  (Gewichtsmittel, bestimmt mittels Gelpermeationschromatographie im Vergleich zu einer Eichung mit Pullulanstandard) der erfindungsgemäß

verwendeten Polyglucane/saccharide können in einem weiten Bereich von  $10^3$  g/mol bis  $10^7$  g/mol variieren. Bevorzugt liegt das Molekulargewicht  $M_w$  in einem Bereich von  $10^4$  g/mol bis  $10^5$  g/mol und besonders bevorzugt von  $2 \times 10^4$  g/mol bis  $5 \times 10^4$  g/mol. Ein weiterer vorteilhafter Bereich ist von  $2 \times 10^3$  bis  $8 \times 10^3$ .

Es hat sich gezeigt, daß die Molekulargewichte für das Verzweigenen enthaltende Polyglucan auch höher liegen kann.

Die Molekulargewichtsverteilung bzw. Polydispersität  $M_w/M_n$  kann ebenfalls in weiten Bereichen je nach Ursprung und Herstellungsverfahren des Polyglucans/saccharids variieren. Bevorzugte Werte sind von 1,01 bis 50, insbesondere von 1,5 bis 15. Dabei nimmt die Polydispersität mit einer bimodalen Verteilung der Molekulargewichte zu.

Wie bereits erwähnt, können erfindungsgemäß den Polyglucanen mit Verzweigenen wasserunlösliche lineare Polysaccharide, vorzugsweise wasserunlösliche lineare Polyglucane, beigemischt werden.

Es können auch andere Polymere, insbesondere andere biokompatible oder bioabbaubare Polymere, zugesetzt werden. Dabei hängt die Menge des oder der anderen Polymeren, die zugesetzt werden, ohne daß die sphärische Gestalt und/oder sonstige Eigenschaften der herzustellenden Mikropartikel verändert werden, stets von dem zugesetzten Polymer ab. Sie kann bis zu 10% oder mehr betragen, bezogen auf den Anteil Polyglucan mit Verzweigenen und ggf. lineares Polysaccharid, in bestimmten Fällen auch weniger. Die zulässige maximale Menge hängt von dem jeweiligen Einzelfall ab und kann von einem Fachmann leicht durch Routineversuche bestimmt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel werden die Ausgangssubstanzen, wie das Polyglucan mit Verzweigenen und ggf. lineares Polysaccharid etc., in einem Lösungsmittel gelöst. Beispiele für geeignete Lösungsmittel sind Dimethylsulfoxid (DMSO), Formamid, Acetamid, N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid, N-Methylmorpholin-N-oxid in Gegenwart von Wasser, weitere N-substituierte Morpholin-N-oxide, wäßrige Lösungen mit hohem oder niedrigem pH-Wert oder Mischungen aus den vorstehend genannten Lösungsmitteln, wobei DMSO besonders bevorzugt ist. Selbstverständlich können auch andere, dem Fachmann für diesen Zweck geläufige Lösungsmittel verwendet werden.

Die Gesamtkonzentration (Konzentration Polyglucan mit Verzweigenen plus ggf. Konzentration an linearem Polysaccharid) in dem Lösungsmittel kann je nach Bedarf in weiten Grenzen variieren. Vorzugsweise liegt sie in einem Bereich von 0,02 g (Polyglucan mit Verzweigenen + Polysaccharid)/ml (Lösungsmittel) bis 1,0 g/ml, insbesondere von 0,05 g/ml bis 0,8 g/ml und besonders bevorzugt von 0,3 g/l, bis 0,6 g/l.

Beispiele für Fällmittel sind Wasser, Dichlormethan, ein Gemisch aus Wasser und Dichlormethan, Gemische aus Wasser und Alkoholen wie Methanol, Ethanol, Isopropanol, wobei Wasser sowie ein Gemisch aus Wasser und Dichlormethan besonders bevorzugt sind.

Vorzugsweise wird das Verhältnis Lösungsmittel zu Fällmittel in einem Bereich von 1 : 1000 bis 1 : 4 (Teil Lösungsmittel/Teile Fällmittel), vorzugsweise 1 : 100 bis 1 : 10 und insbesondere 1 : 70 bis 1 : 30 ausgewählt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die die Ausgangssubstanzen enthaltene Lösung und das Fällmittel bei einer Temperatur zwischen 20°C und 50°C zusammengebracht.

Erfolgt das Zusammenmischen bei erhöhter Temperatur, kann das entstehende Gemisch anschließend bei Bedarf gekühlt werden.

Dabei ist es unerheblich, in welcher Reihenfolge das Lösungsmittel und das Fällmittel zusammengebracht werden, z. B. ob das Fällmittel zum Lösungsmittel oder umgekehrt gegeben wird.

Wichtig ist jedoch, daß eine schnelle Durchmischung gewährleistet wird.

Die Temperatur während des Fällprozesses wird im allgemeinen bei einem Wert von plus 10°C bis minus 10°C, vorzugsweise plus 5°C und minus 5°C, gehalten. Bei Bedarf kann sie auch höher oder niedriger gewählt werden.

Der Fällprozeß kann relativ langsam bei tiefer Temperatur über Nacht durchgeführt werden. Er kann durch Variation der Temperatur und des Fällmittels beeinflusst und gesteuert werden.

Weiter können die Prozeßführung sowie die Eigenschaften der Mikropartikel, wie Größe etc. durch Zusatz von Fällungshilfsmitteln beeinflusst werden.

Falls gekühlt wird, muß sichergestellt sein, daß das Gemisch aus Lösungsmittel und Fällmittel liquide bleibt und nicht erstarrt.

Geeignete Fällungshilfsmittel sind z. B. oberflächenaktive Stoffe wie Natriumdodecylsulfat, N-Methylglucosaminid, Polysorbate (z. B. Tween (eingetragene Marke)), Alkylpolyglycolether, Ethylenoxid-Propylenoxid-Blockpolymere (z. B. Pluronic (eingetragene Marke)), Alkylpolyglycol ethersulfate, generell Alkylsulfate und Fettsäureglycol ester, Zucker wie z. B. Fructose, Saccharose, Glucose und wasserlösliche Cellulosederivate.

Die oberflächenaktiven Stoffe können anionischer, kationischer oder nicht-ionischer Natur sein.

Prinzipiell kann jedes wasserlösliche Cellulosederivat verwendet werden, sofern es als Fällungshilfsmittel geeignet ist.

Es kann sich hierbei um chemisch modifizierte Cellulosen jedweder Art handeln. Beispiele sind Celluloseester und Celluloseether und deren Mischformen. Konkrete Vertreter sind z. B. Hydroxypropylmethylcellulosen, Hydroxyethylcellulosen, Carboxymethylcellulosen, Celluloseacetate, Cellulosebutyrate, Cellulosepropionate, Celluloseacetobutyrate, Celluloseacetopropionate, Cellulosenitrate, Ethylcellulosen, Benzylcellulosen, Methylcellulosen etc..

Es können auch Mischungen von verschiedenen wasserlöslichen Cellulosederivaten eingesetzt werden.

Unter dem Begriff "wasserlösliche Cellulosederivate" werden für die vorliegende Erfindung Verbindungen verstanden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB = Deutsches Arzneimittelbuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Auflage, 1987) unter die Kategorie sehr leicht löslich bis schwer löslich fallen.

Üblicherweise werden die Hilfsmittel dem Fällmittel zugesetzt. Die verwendete Menge hängt von dem jeweiligen Einzelfall sowie den erwünschten Partikeleigenschaften ab, wobei die Bestimmung der jeweils vorteilhaften Menge dem Fachmann geläufig ist.

Als vorteilhaft haben sich Konzentrationen von 2 g (Hilfsmittel)/l (Fällmittel) bis 150 g/l, vorzugsweise von 5 g/l bis 80 g/l, und insbesondere 8 g/l, bis 20 g/l, erwiesen. Dies gilt insbesondere auch für das wasserlösliche Cellulosederivat.

Interessanterweise hat sich gezeigt, daß der Anteil an besonders kleinen Partikeln gesteigert werden kann, wenn dem Fällmittel heißwasserlösliches Poly-alpha-D-glucan zugesetzt wird.

Es können hierfür dieselben Poly-alpha-D-glucanverbindungen eingesetzt werden wie sie im Zusammenhang mit den Polyglucanen mit Verzweigenen bzw. den linearen Polysacchariden genannt worden sind.

Bevorzugte Beispiele sind native oder chemisch modifizierte Stärken, aus diesen Stärken gewonnene Poly-alpha-D-glucane sowie stärkeanaloge Verbindungen.

Unter stärkeanaloge Verbindungen werden Verbindungen verstanden, die aus Poly-alpha-D-glucanen bestehen, aber nicht-pflanzlichen Ursprungs sind. Ein Beispiel hierfür ist Glykogen oder Dextran.

Die heißwasserlöslichen Poly-alpha-D-glucane können als Mischung aus einem linearen und einem verzweigten Anteil eingesetzt werden, wie sie z. B. in Stärke vorliegt. In diesem Fall sollte der Anteil an linearem Poly-alpha-D-glucan mehr als 15 Gew.-%, vorzugsweise 50 bis 99,5 Gew.-%, insbesondere 60 bis 90 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt 65 bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge Poly-alpha-D-glucan im Fällmittel, betragen.

Sie können aber auch aus verzweigten Strukturen bestehen, wie sie z. B. im Amylopektin oder im Glykogen vorliegen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bedeutet "heißwasserlöslich", daß die Poly-alpha-D-glucane bei Raumtemperatur im wesentlichen unlöslich sind, wobei vorzugsweise der gleiche Maßstab wie für den Begriff "wasserunlöslich" in Zusammenhang mit den verzweigten Polyglucanen bzw. linearen Polysacchariden gilt.

Unter dem Begriff "Lösung" bzw. "Löslichkeit" werden insbesondere auch Suspensionen bzw. die Ausbildung von Suspensionen verstanden wie sie bei der Lösung von Stärke auftreten.

Beispielsweise zeigen die erfindungsgemäß bevorzugten heißwasserlöslichen Stärken bei Raumtemperatur so gut wie keine Löslichkeit in Wasser, während die sogenannten kaltwasserlöslichen Stärken unter diesen Bedingungen leichter löslich sind.

Die heißwasserlöslichen Stärken sind insbesondere dadurch charakterisiert, daß sie bei Erhitzen unter Eigendruck, z. B. in einem Autoklaven, auf eine Temperatur im Bereich von etwa 100 bis etwa 160°C Lösungen bilden, wobei die jeweilige Temperatur von der Art der Stärke abhängt.

Beispielsweise kann Kartoffelstärke bei ca. 100°C bis zur völligen Auflösung gekocht werden, während Maisstärke eine Temperatur von ca. 125°C erfordert.

Für das erfindungsgemäße Verfahren werden die heißwasserlöslichen Poly-alpha-D-glucane dem Fällmittel vorzugsweise in maximaler Konzentration zugesetzt, d. h. es wird eine gesättigte Lösung hergestellt.

Weitere geeignete Bereiche sind von mehr als 0,001 Gew.-% bis 10 Gew.-%, bevorzugt von 0,01 bis 2 Gew.-% und insbesondere von 0,05 Gew.-% bis 0,5 Gew.-%, bezogen auf die eingesetzte Menge an Fällmittel.

Aufgrund ihrer Naturidentität sind die meisten der erfindungsgemäß eingesetzten wasserunlöslichen Verzweigungen enthaltenden Polyglucane und ggf. wasserunlöslichen linearen Polysaccharide sowie deren Abbauprodukte biokompatibel und biologisch abbaubar. Sie besitzen eine hohe Gewebeverträglichkeit und reichern sich nicht in einem tierischen, insbesondere menschlichen, Organismus an.

Unter biologischem Abbau wird dabei jedweder in vivo ablaufende Vorgang verstanden, der zu einem Abbau oder einer Zerstörung der Substanzen, hier der wasserunlöslichen Polyglucane/Polysaccharide führt.

Diese Eigenschaften der Biokompatibilität und der biologischen Abbaubarkeit sind insbesondere für Verwendungen vorteilhaft, die einen menschlichen oder tierischen Organismus betreffen, z. B. in der Medizin, Pharmazie oder Kosmetik.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen sphärischen Mikropartikel, die ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung sind, weisen ebenso wie die in der deutschen Pa-

tentanmeldung Nr. 197 37 481.6 beschriebenen Mikropartikel eine regelmäßige sphärische Gestalt, enge Größenverteilung und gute mechanische Eigenschaften auf.

Die Partikel können mittlere Durchmesser (Zahlenmittlerwert) aufweisen von 1 nm bis 100 µm, bevorzugt 100 nm bis 10 µm und besonders bevorzugt 1 µm bis 5 µm.

Sphärisch im Sinne der Erfindung bedeutet, daß die Mikropartikel annähernd Kugelform besitzen. Bei Beschreibung einer Kugel durch von einem gemeinsamen Ursprung ausgehende, in den Raum gerichtete Achsen gleicher Länge, die den Radius der Kugel in allen Raumrichtungen definieren, ist für die sphärischen Mikropartikel eine Abweichung der Achsenlängen vom Idealzustand der Kugel von 1% bis 40% möglich. Bevorzugt werden sphärische Mikropartikel mit Abweichungen bis 25%, besonders bevorzugt bis 15% erhalten.

Die Oberfläche der sphärischen Mikropartikel kann makroskopisch mit einer Himbeere verglichen werden, wobei die Tiefe von Unregelmäßigkeiten auf der Partikeloberfläche, wie Eindellungen oder Einschnitte, maximal 20% des mittleren Durchmessers der sphärischen Mikropartikel beträgt.

Weiter zeigen die erfindungsgemäßen Mikropartikel vorzugsweise eine Dispersität  $D = \text{Gewichtsmittelwert des Durchmessers } (d_w) / \text{Zahlenmittelwert des Durchmessers } (d_n)$  von 1,0 bis 10,0, vorzugsweise von 1,5 bis 8,0 und insbesondere von 2,0 bis 4,0.

Die hier benutzten Mittelwerte sind wie folgt definiert:

$d_n = \text{Summe } n_i \times d_i / \text{Summe } n_i = \text{Zahlenmittelwert}$   
 $d_w = \text{Summe } n_i \times d_i^2 / \text{Summe } n_i \times d_i = \text{Gewichtsmittelwert}$   
 $n_i = \text{Anzahl der Partikel mit Durchmesser } d_i$   
 $d_i = \text{ein bestimmter Durchmesser,}$   
 $i = \text{fortlaufender Parameter.}$

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff Gewicht ein gewichtetes Mittel, wobei die größeren Durchmesser einen höheren Stellenwert erhalten.

Es versteht sich, daß die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Mikropartikel für alle Anwendungen wie sie in den prioritätsälteren nicht-veröffentlichten deutschen Patentanmeldungen Nrn. 197 37 481.6, 198 03 415.6, 198 16 070.4 oder 198 16 085.2 aufgeführt sind, geeignet sind.

So können sie in reiner Form oder als Wirkstoffträger auch im weitestem Sinne eingesetzt werden, beispielsweise

- als Additive in der Kosmetik für Salben, Puder, Cremes, Pasten etc.
- als Träger für Wirksubstanzen in pharmazeutischen, tiermedizinischen und anderen,
- als Glättungsmittel z. B. zum Verschließen von Poren oder Glätten von Graten,
- als Lebensmittelzusatzstoff, z. B. als Füllkomponente oder zum Verbessern von rheologischen Eigenschaften,
- als Additiv zur Veredlung von z. B. Emulsionspolymerisaten,
- als Trennhilfen, z. B. für die Abtrennung von Verunreinigungen,
- als Verkapselungsmaterial,
- als Träger für magnetische Partikel etc.,
- als Füllmittel für insbesondere bioabbaubare Polymere oder technische Polymere z. B. zur Eigenschaftskontrolle,
- als Additiv zur Eigenschaftskontrolle, z. B. der Porosität, des Gewichts, der Farbe etc.,
- als Partikelstandard zur Eichung oder Bestimmung

- der Partikelgröße unbekannter Materialien etc.,
- als Trägermaterial zur kontrollierten, z. B. retardierten Wirkstoffabgabe,
- als Füllstoff zur Eigenschaftsverbesserung von technischen oder biokompatiblen Polymeren, und
- in diagnostischen Tests, z. B. als Ultraschallmittel.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert. Diese Beispiele dienen der Veranschaulichung und haben keine limitierende Bedeutung.

### Beispiel 1

Herstellung von Mikropartikeln mit einer amyloseangereicherten Stärke

a. Anreicherung des linearen Anteils (Amyloseanreicherung):

30 g Stärke (Hylon VII, Marke der Fa. National Starch) wurden in 500 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Riedel de Haen) 24 Stunden (h) bei Raumtemperatur gerührt. Es bildete sich eine trübe Mischung. Es wurde 20 min. bei 4000 Umdrehungen/Minute (U/min.) abzentrifugiert (Labofuge GL der Fa. Heraeus). Die erhaltene Lösung wurde in 1 l 1-Butanol gefällt und etwa 1 h stehengelassen. Anschließend wurde filtriert. Der Filterkuchen wurde in 3 l kochendem Wasser gelöst. Es wurde auf 60°C gekühlt und 3 g Thymol (Fa. Fluka) zugegeben. Der Ansatz wurde 3 Tage stehengelassen. Danach wurde er für 45 min. aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde anschließend 1 l 1-Butanol dazugegeben und über Nacht ausgefällt. Es wurde 20 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde gefriergetrocknet (Gefriertrocknung der Fa. Christ). Ausbeute: 11,7 g (39%).

b. Verwendung der amyloseangereicherten Stärke zur Herstellung von Mikropartikeln:

1,0 g der vorstehend erhaltenen amyloseangereicherten Stärke wurde in 5 ml DMSO (Riedel de Haen) bei 60°C innerhalb weniger Minuten gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren innerhalb weniger Sekunden in 100 ml Wasser eingetropft. Der erhaltene Ansatz wurde 16 h bei 5°C stehengelassen. Es bildete sich ein feiner weißer Niederschlag in einer milchigen Suspension aus. Der Niederschlag, der die Partikel enthält, wurde abgetrennt, indem der gesamte Ansatz homogen suspendiert und anschließend 10 min bei 3000 U/min. zentrifugiert wurde (Labofuge GL der Fa. Heraeus). Der erhaltene feste Rückstand wurde insgesamt dreimal mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde der erhaltene Feststoff in knapp 10 ml bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt, eingefroren und lyophilisiert (Gefriertrocknung: Christ Delta 1–24 KD). Zur Charakterisierung der Partikel wurden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen angefertigt (REM, Camscan S-4), die in Abb. 1 und 2 gezeigt sind. Anhand der Aufnahmen konnte der Anteil an Partikeln auf etwa 30% geschätzt werden.

c. Nach Wiederholung des unter a. beschriebenen Anreicherungsverfahrens erhöhte sich der Partikelanteil auf etwa 55%, nach einer dritten Wiederholung auf etwa 70%.

### Beispiel 2

Herstellung unter Verwendung einer Mischung aus verzweigtem und linearem Poly(1,4-alpha-D-glucan):

Der Fällungsprozeß wurde im wesentlichen wie unter Beispiel 1b beschrieben durchgeführt. Als Ausgangssubstanz wurde eine Mischung aus 98 mg Poly(1,4-alpha-D-

glucan) (98%) und 2 mg Glykogen (2%) aus Austern (Fa. Fluka) verwendet.

Ausbeute 65,9 mg (60%).

Aus REM-Aufnahmen ergibt sich ein Anteil an Partikeln von mehr als 95% (Abb. 4 und 5).

### Beispiel 3

Herstellung unter Verwendung einer Mischung aus verzweigtem und linearem Poly(1,4-alpha-D-glucan):

Der Fällungsprozeß wurde im wesentlichen wie unter Beispiel 1b beschrieben durchgeführt. Als Ausgangssubstanz wurde eine Mischung aus 90 mg Poly(1,4-alpha-D-glucan) (90%) und 10 mg Amylopektin (10%) (Amioca Powder der Fa. National Starch) verwendet. Aus den REM-Aufnahmen ergibt sich ein Anteil an Partikeln von mehr als 85%.

### Beispiel 4

a. Enzymatische Entzweigung von Amylopektin zur Anreicherung der linearen Strukturen.

In einem 4-Hals-Rührer mit Rückflußkühler (Polymerapparat) wurden 200 ml entionisiertes Wasser vorgelegt. Dazu wurden 50 g Amylopektin (Amioca Powder TFL der Fa. National Starch) gegeben. Es wurde unter Rühren auf 125°C erhitzt und der Ansatz 1 h bei dieser Temperatur gehalten, wobei die Viskosität zunahm. Anschließend wurde im Autoklaven unter Eigendruck 30 min. auf 130°C erhitzt, wobei eine klare, homogen wirkende, dickflüssige Lösung erhalten wurde. Es wurde auf 58°C abgekühlt und 60 mg Pullulanase aus *Bacillus* sp. (1,62 U/mg) (Fa. Fluka), die vorher in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst worden waren, dazugegeben. Der die Pullulanase enthaltende Ansatz wurde 12 h bei 58°C gerührt, wobei die Masse dünnflüssig wurde. Danach wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei die Lösung eine weißliche Färbung annahm.

Nach 6 h Stunden wurde eine Probe (Probe 1) entnommen und aufgearbeitet. Der verbleibende Rückstand wurde nach 12 h abgetrennt und gefriergetrocknet (Probe 2). Ausbeute: 48,5 g.

b. Verwendung des unter a. erhaltenen enzymatisch aufgearbeiteten Amylopektins zur Herstellung von Mikropartikeln.

Es wurde im wesentlichen das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1b. angewandt.

Im Ergebnis zeigte sich, daß mit Zunahme der linearen Strukturen der Anteil an ausgebildeten Partikeln zunimmt:

Probe 1: etwa 50% Partikel

Probe 2: etwa 80% Partikel.

### Beispiel 5

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach dem Deutschen Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg Poly(1,4-alpha-D-glucan) wurden in etwa 0,5 l bidestilliertem Wasser bei 1,3 bar und 130°C 1,5 Stunden in einem Autoklaven (Apparat Certoclav) erhitzt. Vorher war das Gewicht des Autoklaven bestimmt worden.

Anschließend wurde die Apparatur entspannt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Inhalt wurde gewogen. Er entsprach 501,74 g.

Nach weiteren 24 Stunden wurde zentrifugiert und dekantiert. Der erhaltene feste Rückstand wurde getrocknet und ausgewogen. Es wurden 468 mg erhalten, woraus sich ein gelöster Anteil von 96 mg errechnet.



Bezogen auf die eingesetzte Menge an Lösungsmittel folgt daraus, daß zur Lösung von 1 mg Poly(1,4-alpha-D-glucan) 5226 mg Wasser erforderlich sind. Nach der Klassifizierung gemäß DAB fällt diese Substanz somit unter die Klasse "sehr schwer löslich". Gemäß DAB fallen unter diese Klasse alle Substanzen, für die zwischen 1.000 und 10.000 Teile Lösungsmittel erforderlich sind, um 1 Teil der Substanz in Lösung zu bringen.

Dies ist von den 7 Klassen, in die die Löslichkeit gemäß DAB eingeteilt wird, die Klasse 6, wobei die Einteilung von der Klasse 1 "sehr leicht löslich" bis Klasse 7 "praktisch unlöslich" reicht.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen Polysaccharid bestehen, wobei das mindestens eine wasserunlösliche Polysaccharid in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöst wird, die gebildete Lösung in ein Fällmittel oder Fällmittelgemisch eingebracht wird, das dabei entstehende Gemisch gegebenenfalls gekühlt wird und die gebildeten Mikropartikel abgetrennt werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß das wasserunlösliche Polysaccharid ausgewählt ist unter einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan mit einem Verzweigungsgrad von größer Null und maximal 8% und einer Mischung aus einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan und einem linearen Polysaccharid, wobei der Anteil an Verzweigungen enthaltenden Polyglucane in der Mischung maximal 30 Gew.-% bezogen auf das Gesamtgewicht des Polysaccharids und Polyglucans ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das wasserunlösliche Polysaccharid eine Mischung aus einem Verzweigungen enthaltenden Polyglucan mit einem Verzweigungsgrad von größer Null und maximal 8% und einem linearen Polysaccharid ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Verzweigungen enthaltende Polyglucan aus einer pflanzlichen Quelle stammt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die pflanzliche Quelle Stärke ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Verzweigungen enthaltende Polyglucan aus einer tierischen Quelle stammt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die tierische Quelle Glykogen ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Polymergerüst des Verzweigungen enthaltenden Polyglucans aus D-Glucanmonomeren über 1,4-alpha-glykosidische Verknüpfungen aufgebaut ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verzweigungen enthaltende Polyglucan chemisch modifiziert worden ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Verzweigungen enthaltendes Polyglucan ein alpha-amylase resistentes Polyglucan eingesetzt wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mehr als ein Verzweigungen enthaltendes Polyglucan eingesetzt wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung und das Fällmittel bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 50°C vermengt werden und das entstehende Gemisch auf eine Temperatur im Bereich von plus 10°C bis minus 10°C abgekühlt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das entstehende Gemisch auf eine Temperatur im Bereich von plus 5°C bis minus 5°C abgekühlt wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Fällmittel Wasser oder ein wäßriges Medium eingesetzt wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid eingesetzt wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das wasserunlösliche lineare Polysaccharid ein lineares Polyglucan ist.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als wasserunlösliches lineares Polysaccharid Poly(1,4-alpha-D-glucan) eingesetzt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als wasserunlösliches lineares Polysaccharid Poly(1,3-beta-D-glucan) eingesetzt wird.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das wasserunlösliche lineare Polysaccharid ein chemisch modifiziertes Polysaccharid ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das wasserunlösliche lineare Polysaccharid in mindestens einer der Positionen 2-, 3- und 6 verestert und/oder verethert worden ist.

20. Sphärische Mikropartikel mit glatter Oberfläche erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19.

21. Sphärische Mikropartikel, bestehend ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen Verzweigungen enthaltenden Polyglucan.

22. Sphärische Mikropartikel nach Anspruch 21, wobei der Verzweigungsgrad des Verzweigungen enthaltenden Polyglucans größer Null und maximal 8% ist.

23. Sphärische Mikropartikel nach einem der Ansprüche 21 bis 22, zusätzlich enthaltend mindestens ein wasserunlösliches lineares Polysaccharid.

24. Sphärische Mikropartikel nach einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei das Verzweigungen enthaltende Polyglucan verzweigtes Poly(1,4-alpha-D-glucan) ist.

25. Sphärische Mikropartikel nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei das wasserunlösliche lineare Polysaccharid lineares Poly(1,4-alpha-D-glucan) ist.

26. Verwendung von sphärischen Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 20 bis 25 zur Trennung von Stoffgemischen.

27. Verwendung von sphärischen Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 20 bis 25 als Füllmittel in Polymeren.

28. Verwendung von sphärischen Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 20 bis 25 in diagnostischen Test.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

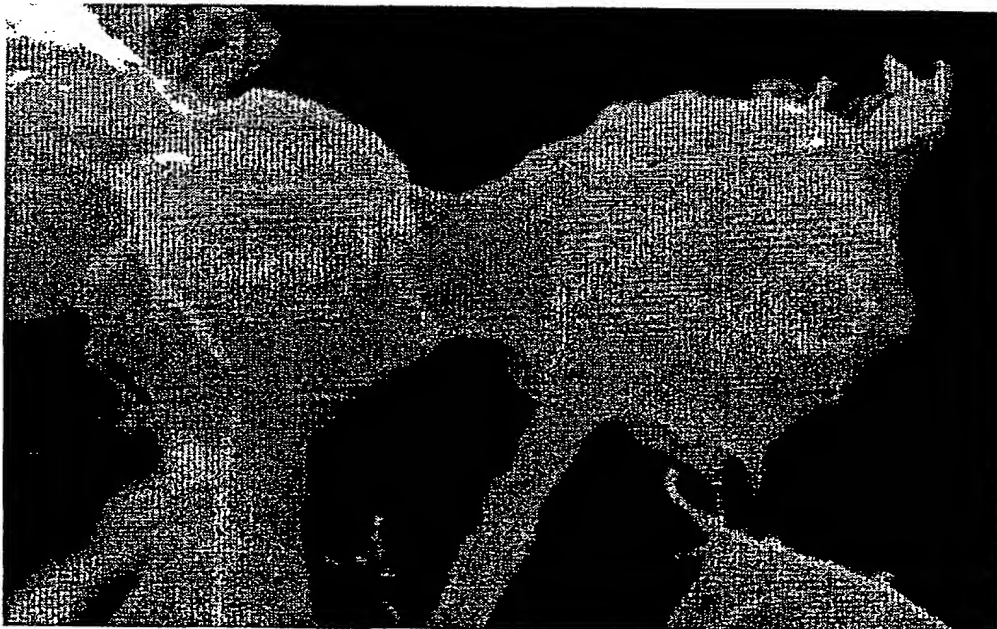


- Leerseite -



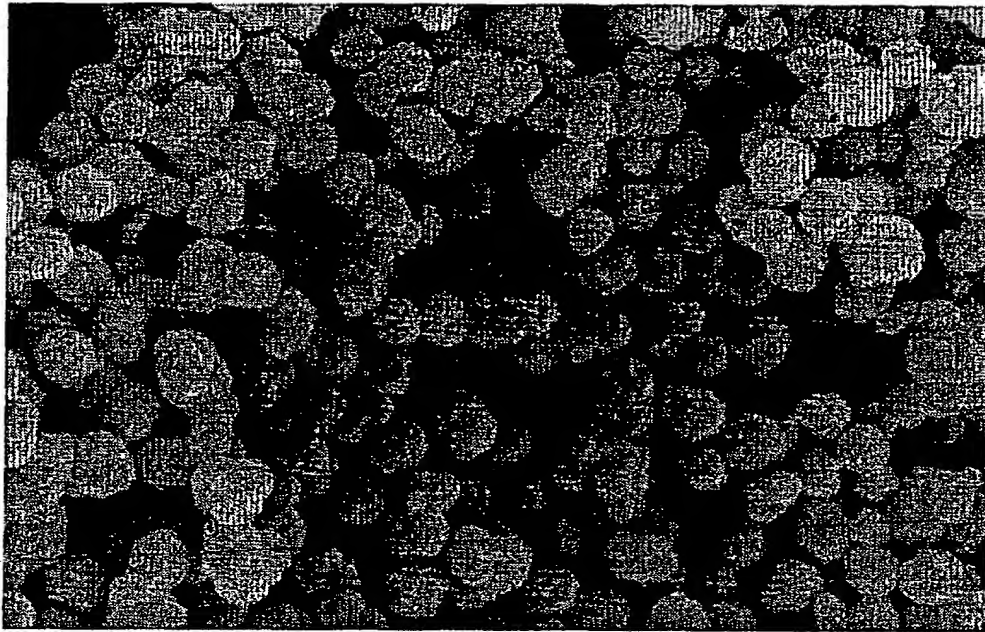
3  $\mu\text{m}$

***Fig. 1***



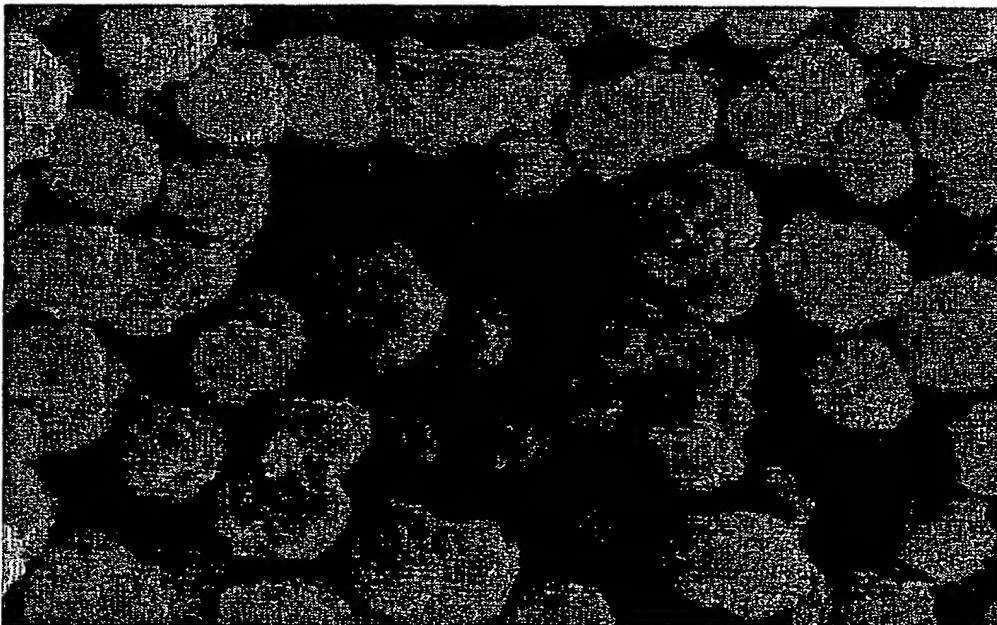
1  $\mu\text{m}$

***Fig. 2***



3 µm

***Fig. 3***



3 µm

***Fig. 4***